

OTKA T 43446 zárójelentés

1. A téma megnevezése:

A Moduláris Szerveződés Szepe a Fehérjék Térszerkezetének Kialakulásában és a Katalitikus Funkció Megvalósításában

2. A munka kezdete és befejezése: **2003. január. 1. – 2006. december 31.**

Kutatásaink két általános kérdés vizsgálatára irányultak:

- 1.) A fehérjék nagyobb szerkezeti egységei (modulok, domének, alegységek) hogyan és milyen törvényszerűségek szerint határozzák meg **a natív térszerkezet kialakulásának** még jelenleg tisztázatlan önszerveződési folyamatát?
- 2.) A különböző szerkezeti adottságokkal rendelkező moduláris fehérjék doménjei között működő kommunikáció milyen kapcsolatban van a funkcionális tulajdonságokkal? Ehhez kapcsolódik az is, hogy a **szerkezeti flexibilitás révén megvalósuló domén-mozgásokat** milyen molekuláris-szintű mechanizmusok irányítják?

Mindkét kérdéskör a fehérjeszerkezeti egységek (modulok, domének, alegységek) a fehérjemolekulán belüli összehangolt viselkedésével függ össze. Munkánk célja a szerkezeti egységek együttműködése törvényszerűségeinek, molekuláris mechanizmusának feltárása volt. Vizsgálatainkat **két különböző komplexitású moduláris fehérjén (enzimen)** végeztük.

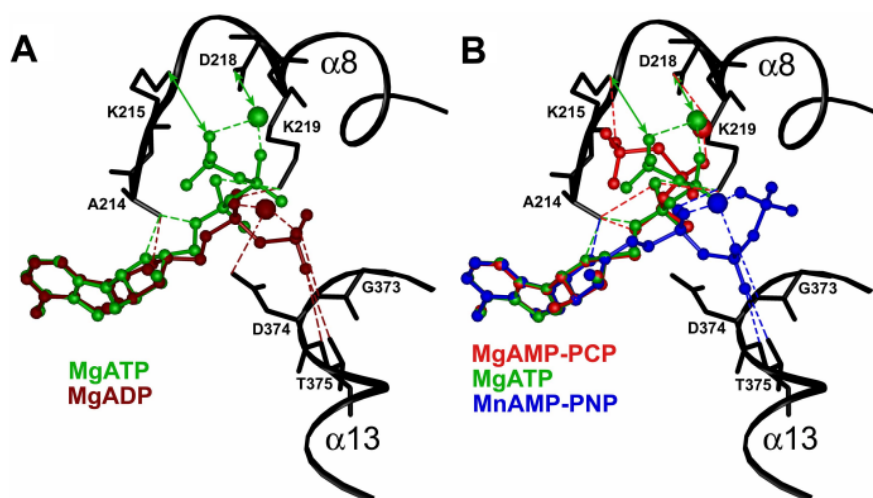
Az egyetlen polipeptidláncból felépülő, két szerkezeti doménre tagozódó **foszfoglicerát kináz (PGK)** esetén a C- és N- terminális domén viszonylag önálló térszerkezet-kialakító képességét már korábbi munkáink megmutatták. Jelenlegi, most befejeződő négy éves kutatási periódusban **az enzim működéséhez szükséges domén-mozgásoknak, a két domén összezáródásának részletes molekuláris szintű mechanizmusát és a szubsztrátoknak ebben betöltött szerepét vizsgáltuk** és írtuk le. A domén-mozgásoknak igen sok más enzim-fehérje működésében is alapvető szerepe van (pl. a szubsztrátok reaktív csoportjainak orientálásában, a zárt aktív centrumban a reakcióhoz szükséges optimális körülmények megteremtésében), de mindeddig alig van arra példa az irodalomban, ahol az ilyen nagyléptékű fehérjeszerkezeti flexibilitás molekuláris szerkezeti hátterét, mozgató rugóit feltárták volna.

Munkánk megkezdésekor a kristályszerkezetek alapján a PGK domének mozgását irányító molekuláris csuklók elhelyezkedéséről már volt elképzelésünk. Azt is tudtuk, hogy az enzim-

szubsztrát kapcsolódás elengedhetetlen a domének együttműködése során megvalósuló doménzáródáshoz, azonban az egyes szubsztrátok külön-külön kifejtett ill. együttes szerepe még tisztázásra várt. Célunk volt annak felderítése, hogy a külön-külön doméneken kötődő szubsztrátok milyen atomi szintű kölcsönhatásokon keresztül irányítják a kötőhelyüktől távol eső molekuláris csuklók működését. Ehhez először is tisztázni kellett az egyes szubsztrátok, így az eddig még nem ismert MgATP, az 1,3-biszfoszfo-glicerát (1,3-BPG) és az enzimaktivitást szabályozó (aktiváló) anionok kötődési módjának bizonytalanságait is.

A PGK nukleotid-szubsztrátja, a MgATP enzimszerkezetre gyakorolt hatása és a vele komplexet alkotó Mg^{2+} -ion szerepének tisztázására meghatároztuk az ATP-t ill. MgATP-t kötő **sértésizom PGK** komplexek krisztallográfiás szerkezetét 1,9 és 2,1 Å felbontásban. A Mg^{2+} -ion távollétében az ATP erősen elektrosztatikus, valószínűleg nem specifikus kölcsönhatást alakít ki az enzimmel. Fémion jelenlétében viszont a foszfátlánc enzimmel való kölcsönhatása látszólag meggyengül.

A MgATP kötődését összehasonlítottuk a már korábbról ismert MgADP-komplex szerkezetével. Megállapítottuk, hogy a Mg^{2+} -ionnal alkotott komplexekben az ATP és ADP foszfát-csoportjai egymástól lényegesen eltérő kölcsönhatásba lépnek az enzimmel. Amíg a fémion az ADP foszfátláncát a domének közötti csukló-régió egyik (13-s számú) hélixéhez rögzíti, addig az ATP foszfátjait egy másik, C-terminális domén-beli hélix (8-s számú) pozitív töltésű N-terminálisa felé orientálja (1A ábra). Az utóbbi hélix a domének közötti csatorna peremén helyezkedik el és az ATP-vel való kölcsönhatása kapcsolatba hozható egyrészt a doménzáródással, másrészt a katalizált reakcióban átadódó foszfo-csoport átmeneti stabilizálásával. A MgADP és MgATP eltérő kötődés-módját a krisztallográfiás adatok mellett az oldott enzimmel végzett kinetikai kettősgátlás, izotermális titráló kalorimetriás (ITC), tiol-reaktivitási és differenciális pásztázó mikrokolorimetriás (DSC) vizsgálataink is alátámasztják. Kísérleti adataink egyértelműen bizonyították, hogy **a MgATP és a MgADP** adenzin részükkel azonos, de **foszfátláncukkal eltérő kölcsönhatásokat alakítanak ki az enzimmel**. Ez mutatkozik meg például abban az ITC-s kísérleti eredményben, hogy míg a MgATP kötődése inkább entrópia-, addig a MgADP-jé inkább entalpia-vezérelt folyamat. Az eltérő kölcsönhatások a DSC-s kísérletek tanúsága szerint azt is eredményezik, hogy a MgADP az enzimet sokkal jobban védi a hődenaturációval szemben, mint a MgATP. Ezek **a különbségek a nukleotidokkal komplexet képező Mg^{2+} speciális hatásának tulajdoníthatóak**. A Mg^{2+} távollétében az ATP és ADP hasonló mértékű védőhatást fejtenek ki a PGK szerkezetére és kötődési állandójuk értéke is hasonló.



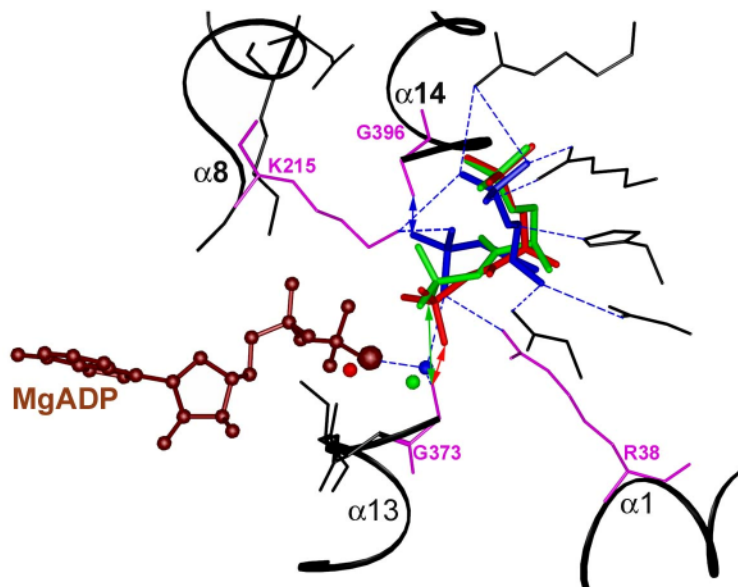
1. ábra

A MgATP kötődési módjának összehasonlítása a MgADP (A) és az ismert nukleotid-analógok (B) kötődési módjával Az A ábrán a zöld MgATP mellett a kötött MgADP (barna) látható. A B ábra a MgAMP-PNP (kék), illetve a MgAMP-PCP (piros) analóg kötődési módját mutatja, a zölddel jelölt MgATP-hez hasonlítva. A nukleotidokat golyós, a kölcsönható oldalláncokat pálcika modell jelöli, a héliceket pedig szalagdiagram. A szerkezetek a nukleotidok adenzin gyűrűje szerint vannak összemásolva.

Vannak azonban különbségek is az oldatkísérletek és a meglévő kristályszerkezetek között. A MgATP analóg MgAMP-PCP és a MgAMP-PNP-vel meghatározott kristályszerkezetek a két analóg foszfátláncának látványosan eltérő kötődési módját mutatták (1B ábra). Azonban a kinetikai kettősgátlás, tiol-reaktivitási és DSC kalorimetriás oldatkísérleteinkben a kétféle analóg és a MgATP hasonló viselkedését tapasztaltuk. Mindebből arra következtetünk, hogy a **kristályos és az oldott enzim közötti különbségek csak látszólagosak**: míg oldatban a MgATP és analógjai foszfátláncának valódi flexibilitása nyilvánulhat meg, addig kristályban a több lehetséges konformációs állapot egyike vagy másika rögzül. Mindennek alapján feltételezzük, hogy **az enzimen kötött MgATP foszfátlánca két alternatív kötőhely között képes elmozdulni és ez által elősegíti a fent említett két hélix (8-s és 13-s) egymáshoz való közeledését, azaz a domének összezáródását és a katalízis során**. A MgATP-nek az ITC titrálási kísérletekből következő entrópia-vezérlés kötődése tehát minden bizonnyal a nukleotid foszfátlánca flexibilitásának tulajdonítható.

Az instabil szubsztrát, a 1,3-biszfoszfoglicerát (1,3-BPG) PGK-hoz való kötődési módját krisztallográfiás módszerrel nem lehet meghatározni, ezért modellezést végeztünk kötőhelyének valószínűsítésére. Ahogy várható volt, az 1,3-BPG a 3-foszfoglicerát (3-PG) ismert helyét foglalja el. A **modellezés továbbá az 1,3-BPG foszfotranszferben közvetlenül részt vevő 1-es foszfátját több, egymástól kissé különböző orientációban és kölcsönhatásban mutatta meg**. Ez arra utal,

hogy a nukleotid-szubsztráthoz hasonlóan, az 1,3-BPG foszfátlánca is elmozdulni képes a kötőhelyét képező hélixek (1-s, 13-s és 14-s) között (2. ábra), s ily módon ezek relatív helyzetét képes befolyásolni. Tehát az 1,3-BPG szubsztrát is hozzájárulhat az aktív centrum optimális geometriájának kialakításához a doménzáródás során.



2. ábra

A modellezett 1,3-BPG elhelyezkedése a PGK zárt aktív centrumában. Az ábrán három 1,3-BPG kötődési módot (kék, piros, fekete) láthatunk, melyek az 1-es foszfát pozíciójában különböznek. A modellezések során a vízmolekulák pozíciója is változott, az adott 1,3-BPG-hez tartozó vízmolekulát a megfelelő szín jelöli. A szerkezetben kötött MgADP-t barna golyós modell ábrázolja. A héliceket szalagdiagram, a kölcsönhatásokat szaggatott vonalak jelzik.

A PGK aktivitását szabályozó **(aktiváló vagy gátló) fiziológiás anionok (pirofoszfát, citrát, foszfát) enzimmel való kölcsönhatását** kinetikai, ITC, DSC, illetve tiol-reaktivitás vizsgálatokkal jellemeztük. Megállapítottuk, hogy az anionok töltésével és méretével arányos az enzim működésére és szerkezetére kifejtett hatásuk. Kinetikai (kettősgátlás, aktiválás-gátlás) kísérleteinkből az is következik, hogy **a működő enzimen az anionoknak két különböző gátlóhelye van.** Ezt az eredményt a kristályszerkezeti adatokkal összevetve megállapítható, hogy a két anionkötőhely egyike azonos a 3-PG szubsztrát foszfátjának (azaz az 1,3-BPG 3-as foszfátjának), a másik pedig az 1,3-BPG 1-es foszfátjának kötőhelyével. Próbálkoztunk a kinetikai kísérletek alapján kimutatott aktiváló anionkötőhely közvetlen kötődési kísérletekben történő azonosítására is. Ez azonban nem vezetett eredményre, ami az aktiváló anion PGK-val való gyenge kölcsönhatásának tulajdonítható. Ezért **modellezést** végeztünk az aktiváló anionok lehetséges kötőhelyének megállapítására. Ily módon **három anionkötőhelyet tudtunk kimutatni**

az enzimmolekula felszínén, az aktív centrum közelében. Érdekesség, hogy az anionkötőhelyek kialakításában szubsztrátok kötődésében is szerepet játszó oldalláncok is részt vesznek.

A fenti, szubsztrátokra, illetve anionokra vonatkozó megállapítások felvetették azt a lehetőséget, hogy **a MgATP foszfátláncának, illetve az 1,3-BPG 1-es foszfátjának flexibilitása**, továbbá az aktiváló anionok kötődése **fontos szerepet játszik** az enzim aktív konformációjának kialakításában, azaz **a doménzáródásban**. A kristályszerkezeti adatok szerint a 8-as hélixbeli **Lys 215**, illetve az 1-es hélixbeli **Arg 38** azok az oldalláncok (lila színűek a 2. ábrán), melyeknek szerepe van a MgATP foszfátjaival, az 1,3-BPG 1-es foszfátjával és/vagy az aktiváló anionokkal való kölcsönhatásban. Ezen oldalláncoknak nemcsak közvetlen, hanem közvetett szerepe is lehet a katalízisben a doménzáródás szabályozásán keresztül.

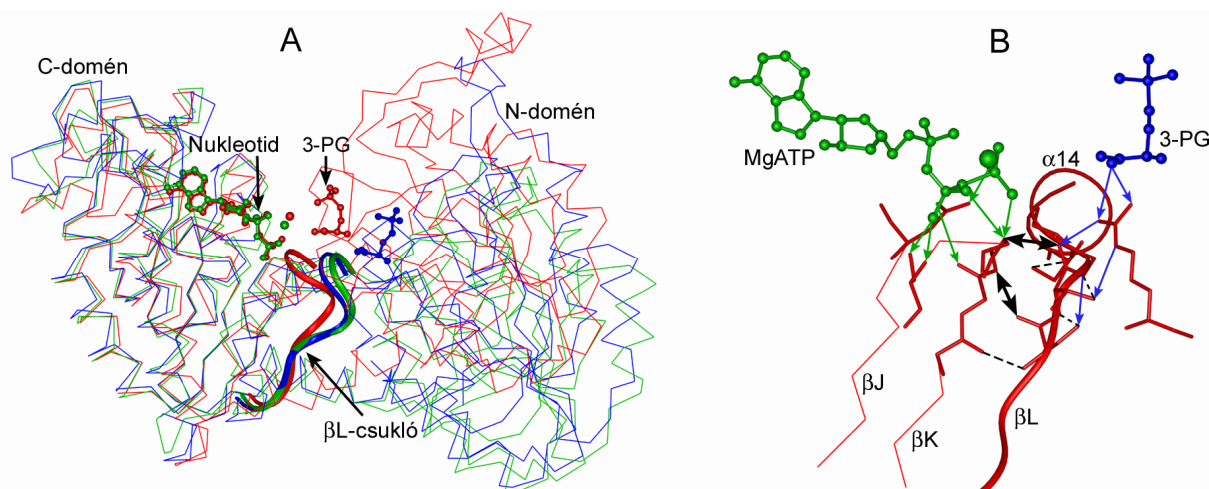
A feltételezés igazolására/cáfolására mindkét oldalláncot **helyspecifikus mutagenézissel** alaninra cseréltük. Ehhez szükséges volt, hogy az emberi eredetű, **humán PGK *E. coli*** sejtekből való expresszióját laboratóriumunkban megoldjuk, és izolálására módszert dolgozzunk ki. Ezen enzim szekvenciája 98 %-ban azonos az eddigiekben vizsgált sertésizom PGK-éval. Az enzim expressziója lehetővé tette az irányított mutagenézises kísérleteket. DSC és CD-mérésekkel bizonyítottuk, hogy a mutációk nem okoztak lényeges változást a fehérje térszerkezetében. Mindkét mutáns PGK aktivitása lényegesen (1/2000-ed ill. 1/700-ad részére) csökkent a vad típusú enzimhez képest, **bizonyítva az Arg 38-n kívül a Lys 215 alapvető szerepét is a katalízisben**. Szubsztrát-kötődési és enzimkinetikai vizsgálataink megmutatták, hogy míg a K38A mutánsnál az 1,3-BPG szubsztrát, a K215A mutánsnál pedig a MgATP az, amelynek kötődését jellemző K_d érték megnő. Főként azonban a kinetikus K_m érték nő meg mindkét esetben sokszorosára. A kísérleti adatokból arra következtetünk, hogy **az Arg 38 ill. a Lys 215 oldallánc már a nyitott konformációban, a megfelelő biner komplexekben kölcsönhatásba lép az 1,3-BPG 1-s foszfátjával, ill. a MgATP gamma-foszfátjával**, igazolva a krisztallográfiás és a modellezési eredményeinket. **A működő turner komplexekben a szubsztrát-foszfátoknak az Arg 38 ill. a Lys 215 oldalláncokkal való kölcsönhatása fennmarad**, miközben az enzimreakció során átadódó foszfát-csoport a reakció szempontjából optimális térhelyzetbe kerül. Így például a Lys 215 oldallánc valószínűleg a MgATP gamma-foszfátjával együtt mozdul el a doménzáródás során. **A zárt konformációban az Arg 38 és a Lys 215 együtt stabilizálhatja a reakció átmeneti állapotát, és emellett aktív részese is a katalízisnek.**

A fenti két mutáns enzim további érdekes tulajdonsága, hogy azok teljesen elvesztették a vad-típusú enzimre jellemző tulajdonságot, az anionok általi szabályozhatóságot (aktiválhatóságot) is. Ez bizonyítja, hogy az **Arg 38 és Lys 215**, nemcsak fontos katalitikus oldalláncok, **hanem az aktiváló anionok megkötésében is szerepet játszanak**, ahogy azt modellezésünk is valószínűsítette.

A doménzáródás mechanizmusának megértéséhez tehát közelebb vittek kalorimetriás kísérleteink is, mivel a domének igen szoros együttműködését, továbbá mindkét szubsztrát kötődésének szükségességét jelezték. A PGK doménjei közötti kooperativitás és a szubsztrátokkal való kölcsönhatás vizsgálatára a sertésizom és élesztő PGK hőstabilitását **mikrokalorimetriás és fluorimetriás módszerrel** vizsgáltuk. Mindkét esetben aszimmetrikus hőátmenetet figyeltünk meg és az egyes enzimek stabilitására jellemző T_m -értékek a szubsztrátok jelenlétében magasabb hőmérsékletek felé tolódtak. Annak eldöntésére, hogy az aszimmetrikus jelleg a doménszerkezetnek tulajdonítható-e, két olyan mutáns molekulát készítettük az élesztő PGK-ból, melyek közül az egyik csak az N-terminális (W122), a másik pedig csak a C-terminális (W333) doménben tartalmaz egyetlen fluoreszcens Trp oldalláncot. Az egyes mutánsokra jellemző átmeneti hőmérsékletek továbbra is, a módszertől függetlenül, azonosnak adódtak. Ez azt jelenti, **hogy az N- illetve a C-terminális domén kitekeredése párhuzamosan, nagyon kooperatív módon történik**. A szubsztrátok védőhatása is ezt támasztja alá: a 3-foszfoglicerát az N-doménhez, a nukleotid (MgADP, MgATP) pedig a C-doménhez kötődve, külön-külön a teljes fehérjemolekula szerkezeti stabilitását növeli. Méréseink azt is megmutatták, hogy a szubsztrátok terner komplexben tapasztalt szerkezet-stabilizáló hatása nagyobb, mint az egyes biner komplexekben. Ez a viselkedés azonban már nem áll fenn a kémiaiilag módosított, inaktív PGK esetén, amelynél korábban bizonyítást nyert, hogy a szubsztrátok együttes kötődésekor sem megy végbe a doménzáródás. Mindez azt valószínűsítette, hogy a **mindkét szubsztrátot kötő, natív terner komplexben mehet csak végbe a domének összezáródása**. Ezt a következtetést erősítették meg a PGK biner és terner enzim-szubsztrát komplexeivel végzett **kisszögű röntgenszórásos (SAXS)** méréseink, melyeket Dmitri Svergun kutatócsoportjával (EMBL Workstation, Hamburg) együttműködésben végeztük.

A fenti oldatkísérletekből az enzim-szubsztrát kölcsönhatásokra kapott információkat és a különböző enzim-szubsztrát komplexek kristályszerkezeti adatait felhasználva **molekuláris grafikai analízissel meghatároztuk a két domén kooperatív viselkedésének lehetséges molekulászerkezeti alapjait**. Feltérképeztük az atomi kölcsönhatások szintjén az egyes

szubsztrátok lehetséges hozzájárulását a fehérjemolekula konformációs stabilitásához és a zárt konformáció kialakulásához. A szerkezeti adatok alapján érthetővé vált, hogy **az egyes szubsztrátok külön-külön a biner komplexekben nagymértékben stabilizálják azt a domént, amihez kötődnek**, mivel kötődésükkel lényegében összetartják az egyes domének másodlagos szerkezeti elemeit. Az analízisből az is kiderült, hogy **a két szubsztrát együttes kötődésekor** a terner komplexben csupán **néhány további H-híd kötés alakul ki** (3. ábra) a PGK fő csukló régiójaként számontartott L jelű β -redőnél a két domén között. Ez kiterjesztését jelenti az egyes biner komplexekben már kezdeményeiben meglévő H-kötés rendszernek, és **lényegesen megváltoztathatja a β -redő konformációját**.



3. ábra

A PGK fő csukló régióját (A) és annak működését (B) szemléltető ábrák

A: A doméneket különböző relatív helyzetben mutató PGK kristályszerkezetek: két nyitottabb biner (zöld és kék) és egy zárt terner (piros) komplex van összehasonlítva. A szerkezetek a C-domén β -redői szerint másoltuk egymásra. A molekulákat az α C atomokat összekötő vonal, az L jelű β redőt szalagdiagram jelzi.

B: A zárt szerkezetű terner komplex β L redőjének környezete látható. A 3-PG (kék), illetve a MgATP (zöld) hatására kialakuló atomi kölcsönhatásokat nyilak jelzik. A fekete nyilak a terner komplexben, a szubsztrátok együttes hatására kialakuló kölcsönhatásokat mutatják.

Feltételezhető, hogy ez a molekuláris folyamat eredményezi a két domén relatív pozíciójának megváltozását, azaz a domének összezáródását. Ehhez a folyamathoz járulhatnak hozzá az átmenő foszfo-csoportot tartalmazó szubsztrátok (MgATP ill. 1,3-BPG) azáltal, hogy mozgékony foszfátjaik segítségével, a fentiekben leírt módon közelítik egymáshoz az aktív centrumot kialakító négy különböző hélixet, amely további atomi kölcsönhatások kialakulásához vezet. Tehát valóban szoros összefüggés lehet a szubsztrátok szerkezet-stabilizáló hatása és a doménzáródás bekövetkezése között. Hipotézisünk szerint a doménzáródás folyamatának **legfontosabb mozzanata a két szubsztrát együttes hatására**

kialakuló speciális H-kötés rendszer, ami kettős molekuláris kapcsolóként fogható fel. Ez mozgathatja a PGK fő csukló régióját, azaz alakíthatja ki az L jelű β -redő doménzáródáshoz szükséges optimális konformációját.

A fenti szerkezeti analízis felvetette az **L jelű β -redő és az azt alkotó konzervatív aminosav-oldalláncok kulcsfontosságú szerepét** a doménzáródás folyamatában, azaz az enzim működésében. A kérdés további vizsgálatára a **humán PGK-nál újabb mutációkat** hoztunk létre, egyrészt a β L-ben (S392A, T393A), másrészt a vele oldallánc-kölcsönhatások révén kapcsolatban lévő α helix 7-ben (E192A, F190A), helix 5-ben (F165A) és helix 14-ben (S398A). Az egyes mutációk külön-külön nem vezettek az aktivitás drasztikus elvesztéséhez, a legkisebb aktivitással rendelkező mutáns (T393A) is még kb. 10 % aktivitást mutatott. Mindez azt mutatja, hogy **nem egyetlen oldallánc, hanem az oldallánc-kölcsönhatások kooperatív együttműködése a felelős a fő csukló működéséért.** Magának a β L-redő polipeptid-vázának alapvető szerepét bizonyítja, hogy a T393 deléciós mutáns enzimaktivitása oly mértékben elveszett, hogy a kimutathatóság határát súrolta. **A nukleotid-szubsztrát konformáció-változtató hatásának a fő csuklóhoz való közvetítésében feltehetően szerepet játszó,** és a nukleotidot is kötő Lys 219, Asn 336, Thr 375 és Glu343 oldalláncok szerepét szintén alaninra történő mutációjukkal vizsgáltuk. A különféle enzimológiai és fizikai-kémiai vizsgálatok még folyamatban vannak, annyi azonban bizonyos, hogy a nukleotid kötésében résztvevő oldalláncok közül (a korábban említett és vizsgált Lys 215 mellett) a Lys 219 és Asn 336 szintén alapvetően szükségesek az enzim működéséhez és a domének záródásához, mivel a nukleotid-szubsztrát hatását képesek közvetíteni a fő csukló régióhoz. Fontos szerepüket az is mutatja, hogy bár a másik szubsztrát, a 3-PG kötésében nem vesznek részt a biner komplexekben, mutációjuk mégis mindkét szubsztrát K_m értékét jelentősen megnöveli, azaz a katalitikus komplexben létrejövő és a katalitikus történésekért felelős enzim-szubsztrát kölcsönhatásokat szabályozzák.

Összefoglalva, a PGK enzimmel végzett különböző típusú (enzimológiai, krisztallográfiai és fizikai-kémiai) kísérletekből, molekuláris modellezésből és a kristályszerkezeti adatok grafikus analíziséből **új megállapításokat tettünk az enzim-szubsztrát kölcsönhatások molekuláris részleteire.** Ennek során kiderült, hogy az enzim-szubsztrát kapcsolat megengedi a szubsztrát bizonyos mozgékonyágát az aktív centrumban. Ez a mozgékonyág összefüggésbe hozható az enzim aktív konformációjának kialakulásával, melyért **mindkét**

szubsztrát együttes kötődésekor kialakuló speciális H-kötés-rendszer felelős. Ez, mint egy kettős molekuláris kapcsoló, bizonyos konzervatív oldalláncok részvételével **irányítja, az enzimmolekula fő csukló régiójának mozgását**. A molekuláris csukló működésének leírása egyben feltárta a PGK doménzáródási mechanizmusának részleteit, és példát szolgáltat arra is, hogy milyen stratégiát érdemes követni más, több doménből felépülő enzimek működésének szerkezeti alapokon való megértéséhez.

A dimer szerkezetű **izopropilmalát-dehidrogenáz (IPMDH)** esetén az enzim térszerkezet-kialakulási folyamatát tanulmányoztuk, amely két szempontból is érdekes. Egyrészt a fehérjék natív térszerkezete kialakulásának mechanizmusa még ma sem tisztázott és különösen keveset tudunk a bonyolultabb szerkezetű, pl. oligomer fehérjékről. Másrészt nem tisztázott, hogy a denaturáció és renaturáció ellentétes folyamatainak sebessége hogyan határozza meg a fehérjék konformációs stabilitását, mint pl. a hőstabilitást. A kérdések vizsgálatára összehasonlító **denaturációs-renaturációs kísérleteket** végeztünk a **termofil *Thermus thermophilus*, a mezofil *Escherichia coli* és hidegtűrő *Vibrio* sp.** 15 IPMDH-val.

Feltételeztük, hogy a monomerek dimerekké történő asszociációja az aktív térszerkezet-kialakulásnak fontos lépése, ugyanis az IPMDH aktív centrumok kialakításában mindkét izológ módon összekapcsolódó alegység részt vesz. Ezzel összhangban van az a megfigyelésünk, hogy a renaturáció folyamata (**fehérje-fluoreszcencia ill. enzimaktivitás visszatérése**) mindhárom IPMDH esetén bifázikus időgörbe szerint zajlik. Mivel az időgörbék menete nem függ az alkalmazott fehérje-koncentrációtól, feltételeztük, hogy az IPMDH térszerkezetének kialakulásához szükséges a polipeptidláncok korai szakaszban bekövetkező asszociációja, majd ezen inaktív dimer intermedier szerkezete rendeződik át egy lassabb elsőrendű folyamatban aktív enzimmé. Más típusú, az **ANS fluoreszcens festék** jelenlétében végzett **renaturációs vizsgálataink** egyértelműen alátámasztották egy molten-globula-szerű renaturációs intermedier létezését. **CD-spektroszkópiai mérésekkel** kimutattuk azt is, hogy a másodlagos fehérjeszerkezeti elemek már a renaturáció kezdetén, néhány másodpercen belül kialakulnak. A reaktiválódás és a renaturáció kinetikájának összehasonlító analízisét elvégezve arra következtetünk, hogy már az inaktív intermedier keletkezése előtt kialakul egy jellemző fehérje-fluoreszcenciával rendelkező renaturációs köztitermék, ami természetesen szintén inaktív. Meghatároztuk az intermedier fluorimetriás spektrumát is, amely jobban hasonlít a natív, mint a denaturált IPMDH spektrumához, azaz határozott szerkezetre utal. A fenti adatok alapján a következő mechanizmust állítottuk fel az IPMDH

renaturációjára: $D+D \rightarrow I_2 \rightarrow I_2^* \rightarrow N_2$ (ahol D denaturált monomer, I_2 és I_2^* inaktív dimer intermedierek, N_2 natív dimer). Tehát valószínű, hogy az IPMDH natív térszerkezete kialakulásának előfeltétele a polipeptidláncok asszociációja a renaturáció kezdeti fázisában.

A mechanizmus további vizsgálatára fluorimetriás **gyorskinetikai méréseket** kezdtünk el, a Pushchino-i Fehérjekutató Intézettel együttműködésben, hogy meghatározzuk **a renaturáció kezdeti gyors szakaszának** kinetikai rendűségét. A feltételezett gyors dimerizációnak másodrendű, fehérje-koncentrációtól függő időgörbe felelne meg. A kezdeti kísérletek azonban eddig még nem hoztak egyértelmű eredményt, mert magasabb fehérjekoncentrációnál aggregáció zavarta meg a folyamatot. A probléma megoldásán dolgozunk a kísérleti körülmények változtatásával: GuHCl helyett urea használata denaturálószerként előnyösebbnek látszik.

A **különböző hőstabilitású IPMDH-k renaturációs időgörbéi** nem mutatnak lényeges különbséget: a fehérje kompakt szerkezete (ANS jelölés) és ezzel párhuzamosan az aktivitás néhány perces felezési idővel tér vissza. A renaturáció folyamatával ellentétben az enzim denaturációs kinetikája 8,5 M ureában nagymértékben különbözik: a felezési idők rendre 1 óra, 5 perc és 5 mp, azaz minél nagyobb hőstabilitású az IPMDH, annál lassabban denaturálódik. A szubsztrátok nagymértékben védenek a denaturációval szemben: a védőhatás a termofil enzim esetén a legkisebb, hidegtűrő enzim esetén a legnagyobb, így az enzim-szubsztrát komplexek denaturációja már hasonló időskálán zajlik. **Az IPMDH-k stabilitásbeli különbségei tehát kizárólag denaturációjuk különböző sebességének tulajdonítható.** Ennek hátterében a különböző hőstabilitást eredményező **nem-konzervatív oldalláncok** eltérő természetű kapcsolatának különböző sebességgel történő megszűnése állhat. Az IPMDH-k renaturációjának azonos sebességét pedig feltehetően az IPMDH funkcióhoz szükséges speciális térszerkezet határozza meg, amelynek meghatározó eleme a **konzervatív oldalláncok** közötti kapcsolat, s mint ilyen, azonos mechanizmussal, azonos sebességgel alakul ki, függetlenül a különböző IPMDH-k szerkezeti stabilitásától. A feltételezéseket igazolni látszik a **termofil *Thermus thermophilus*, a mezofil *Escherichia coli*** és a **hidegtűrő *Vibrio* sp.** 15 IPMDH-k térszerkezetének részletes molekuláris grafikai analízise, a konzervatív és nem konzervatív oldalláncok molekuláris kontaktusainak összehasonlító vizsgálata.